

## © EPODOC / EPO

PN - JP4346791 A 19921202  
 TI - MONOCLONAL ANTIBODY  
 FI - C12N5/00&B ; C12N15/00&C ; C12P21/08 ; C12R1/91 ; G01N33/53&S ; G01N33/577&B  
 PA - TAITO KK  
 IN - HIRATA AKIO; SUGAWARA ISAMU; TABATA KENGO; ITO WATARU  
 AP - JP19910116336 19910521  
 PR - JP19910116336 19910521  
 DT - I

## © WPI / DERWENT

AN - 1993-021305 [03]  
 TI - Monoclonal antibody, used for detecting beta-1,3-glycan (-cpd.) etc. - reacts specifically to beta-1,3-glycoside (-bond) contg. oligo- or polysaccharide(s) e.g. Schizophyllan etc.  
 AB - J04346791 The monoclonal antibody reacts specifically to beta-1,3-glycoside bond contg. oligosaccharide or polysaccharide, pref. Schizophyllan, carduran, lentinan, sucreloglucan, carboxymethylated carduran and laminari-tetraose.  
 - Also claimed as new are hybridoma that can produce the monoclonal antibody.  
 - USE/ADVANTAGE - Assay method by using the monoclonal antibody is more effective than Limulus test for detecting beta-1,3-glucan. It can measure beta-1,3-glucan selectively without influence by contaminants in the blood or organ. It can be used widely for detection of beta-1,3-glucan contg. cpds. in house dust, for diagnosis of mycosis, etc.  
 - In an example, for an antigen, suspension composed of Schizophyllan soln. (average mol.wt. 445,000 1 mg/ml; 100 micro-l), 0.1M PBS (pH 7.2; 0.25ml) and Freund's adjuvant (0.255 ml) was used. As animal, BALB/c mouse (6 weeks old, female) was used. After immunisation, spleen cells and mouse myeloma cells X-63-Ag 8-6.5.3 (5 x 10 power 7; 1 x 10 power 7) were fused with PEG1540. Obtd. hybridoma were selected with 96 holes plates, HAT medium, and ELISA technique. Hybridoma PG1-HS was selected, and deposited as FERM P-12262. (Dwg.0/0)  
 IW - MONOCLONAL ANTIBODY DETECT BETA GLYCAN COMPOUND REACT SPECIFIC BETA GLYCOSIDE BOND CONTAIN OLIGO POLYSACCHARIDE SCHIZOPHYLLAN  
 AW - OLIGOSACCHARIDE  
 PN - JP4346791 A 19921202 DW199303 C12P21/08 006pp  
 IC - C12N5/20 ; C12N15/06 ; C12P21/08 ; G01N33/577  
 MC - B04-B04A3 C04-B04A3 B04-B04C5 C04-B04C5 B12-K04 C12-K04 D05-H09 D05-H11  
 DC - B04 C07 D16  
 PA - (TAIT ) TAITO KK  
 AP - JP19910116336 19910521  
 PR - JP19910116336 19910521

## © PAJ / JPO

PN - JP4346791 A 19921202  
 TI - MONOCLONAL ANTIBODY  
 AB - PURPOSE: To provide a monoclonal antibody specifically reacting with a beta-1, 3-glycoside bond contained an oligosaccharide or polysaccharide and used for the determination of a fine amount of beta-1, 3-glucan useful for the diagnosis of cancers, house dust syndromes, mycosis, etc.  
 - CONSTITUTION: The production of the objective monoclonal antibody specifically reacting with the beta-1,3-glycoside bond-containing oligosaccharide or polysaccharide such as schizophyllan comprises administering a mixture of the polysaccharide such as schizophyllan with freund's adjuvant into the abdominal cavity of a BALB/c mouse to immunize the mouse, collecting splenic cells from the finally immunized mouse, fusing the splenic cells to mouse myeloma cells by the use of polyethylene glycol, culturing the fused cells in a HAT medium, screening a clone producing an antibody specifically reacting with a beta-1,3- glycoside bond from the produced hybridomas, cloning the screened clone by a limiting dilution analysis method, etc., and subsequently culturing the monocloned hybridoma.  
 I - C12P21/08 ; C12N5/20 ; G01N33/577  
 C - C12P21/08 C12R1/91  
 SI - C12N15/06  
 PA - TAITOU KK

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

IN - HIRATA AKIO; others: 03  
ABD - 19930420  
ABV - 017200  
GR - C1050  
AP - JP19910116336 19910521

**THIS PAGE BLANK** (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-346791

(43) 公開日 平成4年(1992)12月2日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
C 1 2 N 5/20				
G 0 1 N 33/577	B	9015-2J		
		7236-4B	C 1 2 N 5/00	B
		8828-4B	15/00	C
審査請求 未請求 請求項の数4(全 6 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平3-116336

(22) 出願日 平成3年(1991)5月21日

(71) 出願人 000204354

台糖株式会社

東京都中央区日本橋大伝馬町7番5号

(72) 発明者 平田 昭夫

東京都稲城市平尾1-55-1 サンパーク

平尾2-202号

(72) 発明者 菅原 勇

埼玉県新座市栗原1-3-8

(72) 発明者 田畑 ▲けん▼吾

兵庫県神戸市須磨区須磨寺町4丁目5-8  
-303

(72) 発明者 伊藤 渡

兵庫県加古川市野口町野口356-6

(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外7名)

(54) 【発明の名称】 単クローン抗体

(57) 【要約】

【構成】 オリゴ糖または多糖に含まれる $\beta$ -1, 3-グリコシド結合と特異的に反応する単クローン抗体。当該単クローン抗体は、シゾフィラン、カードラン、レンチナン、スクレログルカン、カルボキシメチル化したカードラン及びラミナリテトラオースと反応する。

【効果】  $\beta$ -1, 3-グリコシド結合を含む糖類の微量定量手段が提供され、各種生理活性を有する $\beta$ -1, 3-グルカン等の定量を正確かつ容易に行うことを可能とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 オリゴ糖または多糖に含まれる $\beta$ -1, 3-グリコシド結合と特異的に反応する単クローン抗体。

【請求項2】  $\beta$ -1, 3-グリコシド結合を含むオリゴ糖または多糖と特異的に反応する請求項1記載の単クローン抗体。

【請求項3】 シゾフィラン、カードラン、レンチナン、スクレログルカン、カルボキシメチル化したカードラン及びラミナリテトラオースと特異的に反応する請求項1又は2記載の単クローン抗体。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の単クローン抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、オリゴ糖または多糖に含まれる $\beta$ -1, 3-グリコシド結合と特異的に反応する単クローン抗体、及び該単クローン抗体を産生するハイブリドーマに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 純粋な多糖は高分子物質であるにもかかわらずその免疫原性は低いので、生体に投与された場合、抗体産生能力は同じ高分子物質である蛋白質に比較して非常に弱く、抗多糖抗体はできにくい。そのためか、糖ペプチド、糖蛋白、リポ多糖等の複合糖質を抗原として用いた免疫学的研究は従来より広範囲に行なわれておりそれらに対する抗体も数多く報告されているのに対し、純粋な多糖に対する抗体の存在は殆ど知られていない。

【0003】 殊にグルコースだけからなる純粋なグルカンについては、古くから代用血漿として臨床で使用されているデキストランに関し、デキストランを投与された患者の中に割合は少ないものの抗デキストラン抗体の存在が確認されているのと (Kawasaki Medical Journal, Vol. 8, No. 2, 77~81, 1982)、また近年の $\beta$ -1, 3-グルカン ( $\beta$ -1, 3-グリコシド結合を主結合とする糖鎖を主鎖とするグルカン) に関する免疫化学的研究の進展において、フクロタケのアルカリ抽出多糖 (Agricultural Biological Chemistry, Vol. 53, No. 7, 1849~1859, 1989) や、スエヒロタケの産生する多糖シゾフィラン (Agricultural Biological Chemistry, Vol. 54, No. 8, 1953~1859, 1990) 等に反応する抗体の存在が報告されている程度にすぎない。

【0004】 しかも多糖のような高分子抗原は多くの抗原決定基を含んでいるのが常であり、多糖をそのまま生体投与して得られる抗体は通例多クローン抗体である。前述の $\beta$ -1, 3-グルカンに対する抗体も全て多クローン抗体であることから、現在のところ $\beta$ -1, 3-グルカンに対する単クローン抗体作製の報告は皆無である。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 近年、 $\beta$ -1, 3-グルカンの生理活性に関する研究が広範囲に行なわれるようになり、種々の $\beta$ -1, 3-グルカンに宿主介在性の免疫賦活作用が認められている。殊に $\beta$ -1, 3-グルカンの一つであるシゾフィランやレンチナン等は宿主の免疫賦活作用に基づいた癌の治療薬として臨床で使用されており、これら多糖の体内分布や体内濃度の正確な把握がその作用の解明のために必要とされている。更にまた、 $\beta$ -1, 3-グルカンの免疫賦活作用を利用する研究が、制癌剤だけでなく他の分野で活発に展開されるようになってきており、複雑な夾雑物と共存する $\beta$ -1, 3-グルカンの特異的に認識する方法の開発が望まれている。

【0006】 従って本発明は、 $\beta$ -1, 3-グルカンの特異的な認識、検出を可能とする手段を提供することを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記のような事情に鑑み、 $\beta$ -1, 3-グルカンの特異的且つ精度の高い検出法を確立すべく鋭意研究を重ね本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、オリゴ糖または多糖に含まれる $\beta$ -1, 3-グリコシド結合と特異的に反応する単クローン抗体、及び該単クローン抗体を産生するハイブリドーマを提供するものである。

【0008】 本発明の単クローン抗体は、オリゴ糖または多糖に含まれる $\beta$ -1, 3-グリコシド結合と特異的に反応し、従って $\beta$ -1, 3-グリコシド結合を有するオリゴ糖あるいは多糖と特異的に反応する。尚、本発明にいうオリゴ糖とは、糖単位二以上から数十個位までの天然及び合成された糖類を示すものであり、多糖とはそれ以上の糖単位からなる糖類をいい、直鎖状及び分枝状のものいずれも含む。さらにこれ等の糖類は、糖タンパク等の複合糖類に含まれるものも包含する。

【0009】 以下に本発明を詳細に説明する。本発明の単クローン抗体は、 $\beta$ -1, 3-グリコシド結合を含むオリゴ糖または $\beta$ -1, 3-グリコシド結合を主結合とする糖鎖を主鎖とするグルカン、例えばシゾフィラン等を抗原物質として使用することにより従来の単クローン抗体の製造、選択方法を使用することにより得ることができる。

【0010】 即ち、上記抗原物質により免疫化した動物から免疫細胞を採取し、該免疫細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを得、所期の単クローン抗体を産生するハイブリドーマを選択し、該ハイブリドーマの産生した単クローン抗体を回収することにより製造することができる。抗原物質として使用する $\beta$ -1, 3-グリコシド結合を含む糖類としては、特に $\beta$ -1, 3-グルカンが好ましい。 $\beta$ -1, 3-グルカンは自然界に広く分布しておりその起源もまちまちであるが、殊に担

3

子菌であるキノコ由来の $\beta$ -1, 3-グルカンが数多く報告され、また研究も活発に行なわれている。カードランやラミナランのように直鎖状の $\beta$ -1, 3-グルカンも存在するが、シゾフィランやレンチナン等側鎖に $\beta$ -1, 6-グリコシド結合を有する $\beta$ -1, 3-グルカンが一般的であり、その分岐の頻度や分岐の長さ等も様々で、従って薬理活性や物性、特に水に対する溶解性などが異っている。

【0011】本発明の単クローン抗体を産生するための抗原として望ましい条件は、まず純度が高いことと、物質としての特性が明確にされていることである。数多くの $\beta$ -1, 3-グルカンの中でもシゾフィランが最も高度に純化され且つ物質としての特性がよく知られていることから、本発明の単クローン抗体の産生用抗原として最も好ましいものである。

【0012】上記抗原物質は被免疫動物に投与される抗原懸濁液中、0.1~10mg/ml、特に0.1~1mg/ml程度の濃度で使用するのが好ましい。被免疫動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ウシ等を使用することができる。一般的に高分子物質は生体内に投与されたとき抗体を投与生体に産生させる能力、即ち免疫原性を有している。しかしながらその免疫原性は高分子物質の種類により大きな差があり、免疫原性の低い物質に対しては免疫原性を高めるために種々の工夫がなされている。アミノ酸、ペプチドあるいは蛋白質の付加又はフロイントのアジュバントとの併用等は免疫原性を高めるための汎用手段としてよく知られており、本発明の単クローン抗体の製造においても使用することができる。

【0013】フロイントのアジュバントは完全アジュバント及び不完全アジュバントのいずれも使用することができる。フロイントのアジュバントは、抗原懸濁液中、50~90容量%程度の量で使用する事が好ましい。抗原懸濁液中の抗原濃度、アジュバントの容量比等は生理食塩水を用いて調整すればよい。

【0014】上記に従って作製した抗原懸濁液を被免疫動物に接種することにより、 $\beta$ -1, 3-グルカン等を抗原として免疫された動物が得られる。例えばマウスを免疫する場合には、抗原懸濁液を1~5回、好ましくは3~5回程度、1~2週間間隔で腹腔内投与、皮下投与等により投与して効率良くマウスを免疫することができる。

【0015】上記のようにして得られた免疫動物から、脾細胞、胸腺細胞、末梢血細胞等の抗体産生細胞を分離することにより抗体産生細胞を得ることができる。例えば脾細胞を抗体産生細胞として使用する場合には、脾臓を摘出した後に脾臓を切断し、培地中での遠心洗浄、ピペティング等の操作により抗体産生細胞を得ることができる。

【0016】細胞融合に使用するミエローマ細胞として

4

はマウス、ラット、ウサギ、ヒトなどの種々の動物の細胞株を使用することができ、例えばヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPR T)を欠損するミエローマを使用することが好適である。このようなミエローマは未融合の状態ではHGPR Tを欠くためにヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT)培地で核酸の合成ができずに死滅するが、免疫細胞と融合しHGPR T活性を回復したハイブリドーマはアミノプテリンで核酸の生合成を阻害されてもヒポキサンチンを利用して生育することができるのでハイブリドーマのみが生育する。また、これらのミエローマ細胞は非分泌型の細胞株であることが好ましい。このようなミエローマ細胞としてはマウスミエローマP<sub>3</sub>/X63-Ag8U1(P<sub>3</sub>U<sub>1</sub>)、P<sub>3</sub>/NS1-1-Ag4-1(NS-1)、P<sub>3</sub>/X63-Ag8-6・5・3(X63・6・5・3)、SP2/0-Ag14(SP2)、ラットミエローマ210・RCY3・Ag1・2・3(Y3・Ag1・2・3)、ヒトミエローマSKO-007、GM1500TG-A12等を挙げる事ができる。

【0017】細胞融合はRPMI 1640等の動物細胞培養培地中で $10^7 \sim 10^8$ 個のミエローマ細胞に5~10倍の数の上記抗体産生細胞を混合して行う。細胞融合促進物質としては平均分子量1000~6000のポリエチレングリコール(PEG)やポリビニルアルコール、センダイウィルス等が使用でき、通常25℃で数分~20分間、好ましくは2~5分間程度の融合を行えばよい。特にPEGを用いることが好ましい。

【0018】細胞融合処理後の細胞からハイブリドーマを選別するには選択培地における選択的増殖を行えばよい。例えば、細胞をNS-1培地等の培地で $5 \times 10^6$ 個/mlとなるように希釈した後に、マイクロタイタープレート上に $10^5 \sim 10^6$ 細胞数/ウェルとなる様に各ウェルに細胞を入れ、各ウェルに例えばHAT培地等の選択培地を加えて、以後適当な間隔、例えば3日間隔で選択培地を交換して培養すればよい。例えばミエローマ細胞としてP<sub>3</sub>/X63-Ag8-6・5・3を使用した場合にはHAT培地で1~2週間程度培養することによりハイブリドーマのみを選別することができる。

【0019】 $\beta$ -1, 3-グリコシド結合に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選別は、例えば酵素免疫測定法(ELISA)により以下のようにして行うことができる。予め $\beta$ -1, 3-グリコシド結合を含む糖類を含有する検体をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH8.0)等の緩衝液に溶解し、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアクリルアミド、シリコン、デキストラン、セルロース等のソフトプレートやガラスプレート、ビーズ、シート、ウェル、チューブ等の固相に添加し室温で放置して吸着させる。次に抗原液体を捨てP

5

BSで洗浄した後に、2%ウシ血清アルブミン(BSA)含有PBSを加えて室温で放置し、抗原の結合していない部位をBSAでブロックする。その後、ハイブリドーマの培養上清を加えた後室温で1~1.5時間放置し、PBSで洗浄する。次にペルオキシダーゼ等で標識した抗マウスイムノグロブリン抗血清(第2抗体)を加えて室温で放置する。PBSで洗浄した後に、酵素基質を加えて発色させ吸光度計等でその発色の程度を測定すれば抗原と結合力のある抗体を産生しているハイブリドーマが検索される。

【0020】上記のようにして抗体産生細胞を選別した後、限界希釈法等によりクローニングを行うことにより単一のハイブリドーマを起源とする抗体産生細胞を得ることができる。上記のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマによる抗体は、培養フラスコや培養瓶を用いて10~15%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地、又は無血清培地等の動物細胞培養用培地で培養して、その培養上清液から得ることができ、培養方法及び条件は通常の動物細胞培養方法に準じて選択すればよい。

【0021】さらに大量の抗体を産生する方法としては、例えばハイブリドーマの親ミエローマ細胞の由来動物と同系動物にプリスタン(2、6、10、14-テトラメチルペンタデカン)等の鉱物油を腹腔内に投与した後、ハイブリドーマを腹腔内投与して大量に増殖させる方法を採用することができる。該方法によれば、ハイブリドーマは10~18日程で腹水腫瘍を形成し、血清及び腹水中に高濃度(約1~20mg/ml)の抗体が産生される。

【0022】さらに単クローン抗体の精製が必要な場合には、該腹水を硫酸分画した後に、DEAEセルロースイオン交換クロマトグラフィー、 $\beta$ -1, 3-グリコシド結合を含む糖類を結合させたセファロース4B等を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー、分子ふるいカラムクロマトグラフィー等によって精製することが可能である。

【0023】上記のようにして $\beta$ -1, 3-グリコシド結合に特異的に反応するモノクローナル抗体が得られる。これらのモノクローナル抗体は他のグリコシド結合、例えば $\beta$ -1, 4-結合、 $\beta$ -1, 6-結合、 $\alpha$ -1, 2-結合、 $\alpha$ -1, 4-結合等とは反応性を有しないものである。

【0024】

【発明の効果】現在 $\beta$ -1, 3-グルカンの微量定量法としてはエンドキシンの検出法として頻用されているリムルステストが用いられているが、リムルステストでは $\beta$ -1, 3-グルカン以外の因子、例えばある種の核酸やペプチドグリカン等にも反応するといわれており、血中や臓器等の生体組織中に存在する $\beta$ -1, 3-グルカンの検出には種々の問題が指摘されている。一方、本発明により得られる単クローン抗体は $\beta$ -1, 3-グリ

6

コシド結合を主結合として含む種々の $\beta$ -1, 3-グルカンに特異的に反応するため、血中や臓器中の夾雑物質に無関係に $\beta$ -1, 3-グルカンだけを選択的に定量でき、リムルステストより優れた定量法を提供する。

【0025】 $\beta$ -1, 3-グルカンの検出の必要性については、前述の通り癌治療の分野のみならず種々の分野において高いものがある。例えば、最近居住環境の変化に伴う種々の疾患としてのハウスダスト症候群が注目されるようになってきたが、その原因物質の一つとして大気中に微量に存在する $\beta$ -1, 3-グルカンが指摘されており、ハウスダスト中の $\beta$ -1, 3-グルカンの有用な検出法が求められている。また、免疫抑制剤の使用頻度の増加やエイズ患者の二次感染等真菌症に対する医学的関心も高まり、抗真菌薬の研究も盛んに行なわれるようになってきたが、真菌の細胞壁には $\beta$ -1, 3-グルカンが存在しているので真菌症の診断にも $\beta$ -1, 3-グルカンの検出が利用できる。

【0026】本発明による単クローン抗体は、このような各種の分野において極めて有用な $\beta$ -1, 3-グルカンの検出手段となるものである。

【0027】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1

シゾフィラン(台糖株式会社製の平均分子量44.5万のもの)の溶液(1mg/ml)100 $\mu$ l、0.1MPBS(pH7.2)0.25ml及びフロイントのアジュバント(完全アジュバントまたは不完全アジュバント)0.25mlからなる懸濁液の全量をBALB/cマウス(6週齢、雌)の腹腔に計5回投与した。投与間隔は2週間で、最初の投与はフロイントの完全アジュバントを、後の4回はフロイントの不完全アジュバントを用いた。5回目の投与の1週間後にマウスを開腹してその脾臓を取り、ピペッティングにより単細胞を得た。これ等の脾細胞を血清無添加のRPMI 1640培地で2回洗浄し、脾細胞 $5 \times 10^7$ 個に対し、別に培養を行ない洗浄したマウスミエローマ細胞(X-63-Ag8-6.5.3) $1 \times 10^7$ 個の割合で混合して遠心分離を行ない、上清を除去した。沈渣をよく溶かし、融合促進剤であるポリエチレングリコール1540(1ml)を37℃で1分間かけてゆっくりと添加し、さらに1分間撹拌して融合を行なった。この融合細胞(ハイブリドーマ)を牛胎児血清添加RPMI 1640培地10mlで懸濁して遠心分離した後、その残渣を96穴培養用プレート一枚にまき、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで1週間培養した。HAT培地で1週間、37℃で培養した後、ハイブリドーマだけを選択的に採取した。それらの培養上清液を採取し、以下の手順によりELISAでシゾフィランとの反応性が最も高いハイブリドーマを選択した。



【0028】シゾフィラン（上記と同じもの。以下「SPG」と略す。）と牛血清アルブミン（以下「BSA」と略す。）との共役体（以下「SPG-BSAコンジュゲート」と略す。BSA；2mg/ml）を20倍希釈した水溶液を96穴ELISA用プレートの各ウェルに50μlずつ添加して室温で30分放置して吸着させた。次に抗原液体を捨てPBSで洗浄した後に、2%BSA含有PBS100μlを各ウェルに加えて室温で30分間放置し、抗原の結合していない部位をBSAでブロックした。その後、上記各ハイブリドーマの培養上清を1ウェル当たり100μl加えた後室温で1時間放置した。陰性対照としては、再蒸留水、PBS、正常マウス血清（以下「NMS」と略す。1：1000希釈）を使用した。その後PBSで洗浄し、ペルオキシダーゼで標識した抗マウスイムノグロブリン抗体（1：1500希釈）を加えて室温で放置した。PBSで洗浄した後に、 $\alpha$ -フェニレンジアミン20mgを20mlのクエン酸緩衝液に溶解し、これに30% $H_2O_2$  50μlを2.5mlのクエン酸緩衝液に溶解したもの200μlを加え、これを各ウェルに100μlずつ加え室温で15分間放置した。その後各ウェルに2M $H_2SO_4$ を50μl添加して反応を停止させた。前述の陰性対照をブランクとして反応液の490nmの吸光度を測定し、最も高い吸光度を示したもののハイブリドーマSPG1-HSを選択した。クローニングを行なってこのハイブリドーマが単一のクローン由来であることを確認した。このハイブリドーマSPG1-HSは、平成3年5月17日付で工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号微工研菌寄12262号（FERM P-12262）として受託された。

【0029】10%牛胎児血清添加RPMI 1640培地で選択したハイブリドーマを培養用フラスコにて増殖させた後、約 $1 \times 10^7$ 個の細胞をBALB/cヌードマウスの腹腔に投与して2週間後に貯留した腹水を採取した。この腹水の遠心分離後の上清から単クローン抗体を精製した。尚、抗体の精製はDEAE-Sephadex A-50（ファルマシア）を用いて以下に行なった。

【0030】再蒸留水で膨潤させたDEAE-Sephadex A-50の5gを再蒸留水（1l×5）、0.2NHCl（500ml）、水（1l）、0.2NNaOH（500ml）

1）、水（1l）で順次洗浄してpHを7とした後、0.03Mリン酸緩衝液（pH8.0、500ml×3）でさらに洗浄し、その後0.5Nリン酸でpHを8とした。その後30分間超音波脱気してエコナラム（日本バイオラッドラボラトリーズ）に充填し、平衡化させた。上記腹水上清2mlを試料として添加し、0.03Mトリス-HCl緩衝液150mlで溶出し、その後0.1、0.2、0.3及び0.4MのNaClを添加した0.03Mトリス-HCl緩衝液の各30mlで順次溶出し3mlのフラクションを集めた。各フラクションのタンパクを定量してタンパクピークの所在を確認し、該ピークの各フラクションのシゾフィランに対する反応特異性を上記と同様のELISAにより確認し、反応特異性を有する画分を合わせてPBSに対して2日間透析した。この反応特異性を有する画分の抗IgG抗体と抗IgM抗体に対する反応性を調べたところ、抗IgG抗体とは殆ど反応しなかったが、抗IgM抗体とは高い反応性を示し、本発明の単クローン抗体はIgM抗体であることが確認された。

【0031】上記のようにして得られた単クローン抗体の反応性を以下のようにして調べた。ニトロセルロース膜にSPG-BSAコンジュゲート（BSA；2mg/ml）をBSA換算で4μg（2μl）スポットして乾燥させた。次に、4%BSA/PBSでブロッキングを行なって抗体の非特異的な結合を抑えた後これを除去し、一次抗体として上記で作製した抗体を添加して室温で60分間反応させた。対照として正常マウス血清（NMS）を使用した。PBSで洗浄して未反応の抗体を除去後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体（DAKOPATTS、1：200希釈）を添加して室温で30分間反応させた。再びPBSで洗浄後、PBS20mlに溶解したジアミノベンジジン（Sigma社）3mg及び30%過酸化水素水10μlを添加した溶液で発色させた。作製した抗体を一次抗体に使用したニトロセルロース膜上のスポットは茶色に呈色した。

【0032】シゾフィラン以外の糖類についても同様にしてその反応性を調べた。その結果を表1に要約する。表1. ドットプロット法による本発明の単クローン抗体と糖類-BSAコンジュゲートとの反応性

BSAコンジュゲートの糖類	構成糖	結合様式	反応性*
シゾフィラン	D-グルコース	$\beta$ -1,3;1,6	+

9		10
カードラン (東京化成)	D-グルコース	$\beta$ -1,3 ++
フコイダン (Sigma)	D-グルコース	$\beta$ -1,2;1,4 -
レンチナン (味の素)	D-グルコース	$\beta$ -1,3;1,6 +
マンナン (Sigma)	D-マンノース	$\beta$ -1,6 -
ブルラン (林原生物研究所)	D-グルコース	$\beta$ -1,4;1,6 -
スクレログルカン (CECA)	D-グルコース	$\beta$ -1,3;1,6 ++
キシラン (生化学工業, 95590)	D-キシロース	$\beta$ -1,4 -
カルボキシメチル化カードラン*	D-グルコース	$\beta$ -1,3 ++
$\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)ガラクトトリオース**	D-ガラクトース	$\beta$ -1,6 -
$\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)ガラクトテトラオース***	D-ガラクトース	$\beta$ -1,6 -
ラミナリテトラオース	D-グルコース	$\beta$ -1,3 +
(生化学工業)		

\* 反応性: ++; 強い陽性、+; 陽性、-; 陰性

\*\* カードランのヒドロキシル基をカルボキシメチル化したもの

\*\*\* 本発明者が合成したもの

上記の結果の通り、本発明の単クローン抗体は、シゾフィラン以外のカードランやスクレログルカン等の $\beta$ -1, 3-結合を含む多糖類のみならず、ラミナリテトラオースのような $\beta$ -1, 3-結合を含むオリゴ糖のBSAコンジュゲートとも反応するが、マンナン、ブルラン、キシラン等の $\beta$ -1, 3-結合を含まない糖類とは反応せず、 $\beta$ -1, 3-結合を特異的に認識し反応するものであることが判る。

#### 【0033】実施例2

ウサギの腹腔にシゾフィラン含有PBS溶液を一定量投与し、4日後に貯留した腹水を採取した。この腹水中にはシゾフィランを食食したマクロファージ等が存在した。これらを集めてPBSで洗浄後、サイトスピン (1500rpm、5分) でスライドグラスに張り付けた。PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) 固定を行ない、1%馬血清/PBSでブロッキングを行なった後、一次抗体として作製した抗体あるいは対照として非免疫マウス血清を使用してABC-GO法 (avidin biotin

complex-glucose oxidase method) で免疫染色した。染色にはキット (Vectastain ABC-GO kit) を使用した。その結果、抗体を使用したスライドグラスではシゾフィランを食食したマクロファージは黒青色に染色されたが、陰性対照は染色されなかった。また、シゾフィラン以外にカードランやスクレログルカンを食べ食したマクロファージも染色されたが、ブルランでは染色されなかった。

#### 【0034】実施例3

シゾフィランを産生する菌体、すなわち *Schizophyllum commune* Friesを水で洗浄して菌体の周囲にある遊離のシゾフィランを除去した。これをスライドグラス上にて乾燥させた。一方、真菌の一種である *Aspergillus* 属の菌に感染したヒトの組織切片をスライドグラスに張り付けた。これらをPLP固定後、実施例3で行なった方法と同様の方法で免疫学的な染色を行なった。その結果、両者共非免疫血清を使用した対照と比較して有意に染色されていた。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

// C12N 15/06

(C12P 21/08

C12R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8310-2J

G01N 33/53

S